



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster en Biotecnología Avanzada

Curso 2019/2020



Búsqueda de nuevas termoenzimas mediante la construcción de metagenotecas.

Busca de novas termoencimas mediante a construción de metaxenotecas.

Screening of new thermozymes by construction of metagenomics libraries.

Alumno: Ismael Adawilkyn Severino Marte

Tutor: Manuel Becerra Fernández

Tutora: M^a Isabel González Siso

En A Coruña, 3 de febrero del 2020



UNIVERSIDADE DA CORUNA

Facultad de Ciencias

Máster Biotecnología Avanzada

Búsqueda de nuevas termoenzimas mediante la construcción de metagenotecas.

Busca de novas termoencimas mediante a construción de metaxenotecas.

Screening of new thermozymes by construction of metagenomics libraries.

Alumno: Ismael Adawilkyn Severino Marte

Tutor: Manuel Becerra Fernández

Tutora: M^a Isabel González Siso

Curso: 2019/2020

En A Coruña, 3 de febrero del 2020

TRABAJO FIN DE MÁSTER

La Dra. María Isabel González Siso y el Dr. Manuel Becerra Fernández autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster: **Búsqueda de nuevas termoenzimas mediante la construcción de metagenotecas** presentado por el alumno **Ismael Adawilkyn Severino Marte**, para su defensa ante el tribunal evaluador.

En A Coruña, el 3 de febrero del 2020

Fdo.: María Isabel González Siso

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por siempre estar conmigo en cada momento y bendecirme todos los días, con mucho más de lo que merezco. Gracias, Dios por no dejarme caer, por darme fuerzas para continuar, por ayudarme a nunca perder la fe.

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCYT) de mi país República Dominicana por darme el privilegio de ser beneficiado con una beca que cubrió todos mis gastos durante el Máster completo. Muchas gracias por confiar en mí, ya que sin esta ayuda nada de esto sería hoy posible.

Gracias al equipo de investigación del laboratorio de Bioquímica, especialmente al profesor Manuel Becerra Fernández, por siempre estar dispuesto ayudarme y aclarar mis dudas en todo momento, agradezco su paciencia.

A mis amigos y compañeros por esta experiencia que siempre estará en un lugar especial en mi corazón, gracias especialmente a Angélica por ayudarme siempre a que todo este proceso fuera más fácil, por todos esos buenos consejos cuando más lo necesitaba, gracias por todo lo vivido junto y sobre todo gracias por darme una amistad sincera.

Gracias Yaren por llegar a mi vida en el momento perfecto y estar siempre conmigo a pesar de la distancia, por todo tu apoyo y sobre todo por el gran amor que nos une. Por último, pero no menos importante agradezco inmensamente a mi familia, especialmente a mis padres por estar siempre conmigo y brindarme su apoyo incondicional. Gracias por enseñarme el valor de la vida, por todo el sacrificio para que hoy este cumpliendo unas de mis metas, sin su apoyo esto no sería posible, este logro también es de ustedes.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metagenómica	1
1.2 Construcción de metagenotecas	1
1.3 Metagenómica de organismos termófilos	2
1.4 Enzimas de interés industrial	3
1.5 Aguas termales en Galicia	5
1.5 Importancia de la paja de trigo	6
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 Material biológico	6
3.1.1 Recogida y procesamientos de muestras ambientales de aguas termales	6
3.1.2 Paja de trigo	7
3.1.3 Cepa bacteriana	7
3.1.4 Vector de clonación	7
3.1.5 Medios y Condiciones de Cultivo	7
3. 1. 6. Determinación de actividades enzimáticas	11
3.2 MÉTODOS	13
3.2.1 Tinción y observación de células bacterianas al microscopio	14
3.2.2 Técnicas de Manipulación Genética	15
3.2.2.1 Extracción de ADN Metagenómico	15
3.2.2.2 Cuantificación del ADN	15
3.2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa 0.3%	15
3.2.2.4 Fragmentación del ADN metagenómico	16
3.2.2.5 Concentración del ADN fragmentado	17
3.2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa 0.8%	17
3.2.2.7 Ensayo de reparación de los fragmentos de ADN	17
3.2.2.8 Construcción de metagenotecas de aguas termales	18
3.2.2.9 Ensayo de ligamiento de los fragmentos con el vector pSmart	18
3.2.2.10 Preparación de células electrocompetentes	18
3.2.4 Extracción del ADN plasmídico	19
3.2.5 Ensayo de PCR del ADN plasmídico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Construcción de metagenotecas de aguas termales de As Burgas y Río Caldo con el sustrato paja de trigo de Castilla-León o paja de trigo de Galicia.	20

4.2 Resultados de la transformación de células electrocompetentes con los ligamientos.	22
5. CONCLUSIONES	27
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.	4
Tabla 2. Medio de cultivo y nutrientes utilizados (Rahman et al., 2007)	8
Tabla 3. Medios de Cultivo para detectar la presencia de Celulasas	9
Tabla 4. Medio para detectar actividad beta-glucosidasa.	9
Tabla 5. Medio 1 y Medio 2 para detectar la actividad de beta-xilosidasa.	10
Tabla 6. Medio para detectar proteasas.	10
Tabla 7. Medio para detectar actividad xilanasa.	11
Tabla 8. Medio para detectar actividad lipasa.	11
Tabla 9. ADN metagenómico (C: Paja de trigo de Castilla-León; G: Paja de trigo de Galicia)	20
Tabla 10. Detección de actividad feruloil esterasa para los 74 clones obtenidos.	23
Tabla 11. Detección de actividad beta-glucosidasa para los 74 clones obtenidos	25
Tabla 12. Concentración del ADN plasmídico de los nueve clones que presentaron actividad positiva.	26
Figura 1. Vector de clonación empleado (https://www.lucigen.com/pSMART-HC-Amp/).	7
Figura 2. Matrices con los medios de cultivo de enriquecimiento con las muestras de paja de trigo de Castilla-León y Galicia.	14
Figura 3. Electroforesis del ADN metagenómico obtenido de As Burgas y Río Caldo con paja de trigo gallega. M1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb, B: As Burgas, R: Río Caldo, M2: marcador GeneRuler HR.	21

Figura 4. Clon 57 con actividad positiva de la metagenoteca con agua de As Burgas y paja de trigo de Galicia.....24

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BAC: Cromosomas artificiales bacterianos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

°C: Grados Centígrados

dNTPs: Desoxirribonucleótidos Trifosfatos

CE: Commission Enzyme

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

FA: Ácido ferúlicos

g: Gramo

hmw: Alto peso molecular

LB: Medio de Cultivo Luria Bertani

LBA: Medio de Cultivo Luria Bertani con ampicilina

ml: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

M: Molar

mg: Miligramo

ng: Nanogramos

nm: Nanómetro

OD: Densidad Óptica

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm: Revoluciones por Minuto

TAE: Tampón Tris Acetato EDTA

TE: Tampón Tris-EDTA

μL: Microlitro

μg: Microgramo

V: Voltios

Resumen

La metagenómica permite el estudio del genoma completo o parcial de todos los microorganismos que habitan una población determinada sin la necesidad de cultivo. Por medio de la metagenómica ha sido posible descubrir y clonar un número considerable de enzimas, que de la forma tradicional no habría sido posible su identificación. Las industrias en su mayoría buscan enzimas que se adapten a sus procesos de fabricación de manera eficiente y rentable. Por consiguiente las industrias han visto una oportunidad rentable y ecológicamente sostenible en las enzimas de microorganismos que habitan en ambientes extremos. En el presente estudio se investigó la presencia de nuevas termoenzimas de fuentes geotermales de As Burgas y Río Caldo (Ourense, Galicia) mediante metagenómica funcional. Se realizaron cultivos de enriquecimiento con aguas provenientes de estas dos fuentes termales usando como única fuente de carbono paja de trigo de Castilla-Leon o paja de trigo de Galicia. Empleando la técnica de cribado funcional de metagenotecas se investigó la presencia de actividad enzimática para: celulasas, xilanasas, beta-xilosidasas, beta-glucosidasas, proteasas y lipasas. A partir de las metagenotecas obtenidas de las aguas de las termas de As Burgas y Río Caldo cultivadas con paja de trigo de Galicia, se logró aislar 4 clones con actividad beta-glucosidasa, 3 clones con actividad feruloil esterasa, 1 clon con actividad lipasa y 1 clon con actividad beta-xilosidasa.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Metagenómica

La metagenómica permite el estudio de los microorganismos a partir de su material genético, sin necesidad de cultivo, permitiendo acceder de este modo a la información genética tanto de las comunidades microbianas cultivables como de las no cultivables. Hay que señalar que aproximadamente el 99% de los microorganismos no son cultivables, por lo que una solución a esta limitación ha sido el desarrollo de la metagenómica (Amann et al., 1995). El término metagenoteca para referirse al conjunto de genomas de una muestra ambiental, y resaltar la importancia de la clonación del material genético fue acuñado por Handelsman et al.(1998). El ADN metagenómico se puede extraer directamente del medio ambiente, incluyendo agua, suelo o de cultivos de enriquecimiento cultivados a altas temperaturas (López-López et al., 2013).

Por medio de la metagenómica ha sido posible descubrir y clonar un número considerable de enzimas, utilizando principalmente dos estrategias: la metagenómica basada en secuencias y la metagenómica funcional o basada en actividades (DeCastro et al., 2016; Elleuche et al., 2015). La metagenómica basada en funciones asegura que los candidatos seleccionados poseen la actividad esperada, sin embargo, este enfoque aún tiene varias limitaciones para lograr rendimientos óptimos, siendo uno de los principales puntos críticos la exploración de la metagenoteca (Ferrer et al., 2016; Taupp et al., 2011). Por otro lado la metagenómica basada en secuencias no depende de la actividad de la enzima y aplica fundamentalmente la búsqueda de homologías basadas en conocimientos previamente conocidos con actividades particulares, la posterior amplificación de las secuencias encontradas, la clonación en vectores de expresión y la expresión de las proteínas en hospedadores adecuados (Lindgreen et al., 2016).

1.2 Construcción de metagenotecas

Las bibliotecas o metagenotecas implican la colección de genes a partir del ADN de una población completa, para clonarse en un vector replicativo. La construcción de una metagenoteca se realiza a partir de la toma de muestra, extracción y purificación del ADN (Devi et al., 2015). La selección del vector de clonación del ADN metagenómico va a depender del tamaño del fragmento que se quiera insertar. Para los fragmentos pequeños se suele utilizar plásmidos que pueden recibir insertos de <10 kb. Para grandes fragmentos se utilizan los fósmidos con insertos de 25-45 kb, cósmidos con

insertos de 15-40 kb, o cromosomas artificiales bacterianos (BAC) con insertos de 100-200 kb (Culligan et al., 2014). El principal reto que presenta la construcción de metagenotecas suele ser el aislamiento de ADN de alto peso molecular (hwm), requerido con alta pureza, concentración y calidad adecuadas, para que pueda ser representativo de toda la gama de organismos presentes en la comunidad de estudio (Canganella & Wiegel, 2014). Las aguas termales representan un desafío adicional para el aislamiento de ADN de alto peso molecular, esto es debido a que las células microbianas tienden a unirse a pequeñas partículas como minerales de arcilla que requieren ser eliminados, ya que si no se eliminan podrían causar inhibición en el procesamiento de la muestra, provocando inhibición enzimática u obstrucción de filtros y puntas de pipeta (Reigstad et al., 2011).

1.3 Metagenómica de organismos termófilos

Los microorganismos termofílicos habitan en ambientes a altas temperaturas, las enzimas termoestables que viven en estos ambientes poseen numerosas aplicaciones industriales (Haki & Rakshit, 2003). Los microorganismos termófilos se agrupan según el rango de temperatura de su crecimiento: termófilos moderados con temperaturas entre 50-60°C, termófilos extremos en temperaturas 60-80°C y hipertermófilos con temperaturas mayores de 80°C (Tulasi et al., 2013). Estas fuentes permiten obtener información sobre el origen y la evolución de la vida. Los organismos termófilos e hipertermófilos producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas como las lipasas, glucosidasas, peptidasas y otras biomoléculas, que tienen interés industrial (Streit et al., 2004).

Los microorganismos termófilos y los hipertermofilos pertenecen al grupo de extremófilos más estudiados, las enzimas aisladas de estos han sido sometidas a diversas investigaciones y aplicaciones industriales y biotecnológicas, debido a que poseen la capacidad de ser extremadamente termoestables y por lo general resistentes a las acciones de agentes caotrópicos, desnaturalizantes, detergentes, solventes orgánicos, así como a la exposición a pH extremos (Sarmiento et al., 2015).

Ha sido posible la obtención y caracterización de enzimas responsables de catalizar reacciones químicas en ambientes extremos, provenientes de diferentes grupos de microorganismos extremófilos, aplicándose en la actualidad en procesos industriales sostenibles, como es en la síntesis enantioselectiva de fármacos (Littlechild, 2015). Son biodegradables y su empleo es amigable con el medio ambiente, cuentan con una

alta estabilidad en condiciones extremas, sin la necesidad de modificar las condiciones a lo largo de los procesos. También permiten la utilización de materia prima sin procesar, generando una reducción de costos y produciendo pocos productos secundarios (Reed et al., 2013).

1.4 Enzimas de interés industrial

Las enzimas son biocatalizadores que poseen un alto poder catalítico y especificidad de sustrato o reacción. Las industrias buscan moléculas que se adapten a sus procesos de fabricación de manera eficiente y rentable. El uso está limitado por que la mayoría de las enzimas funcionan en condiciones fisiológicas y se inactivan durante procesos operativos en condiciones difíciles. Para solventar este problema, se buscan enzimas que puedan soportar condiciones operativas extremas. Los organismos que tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes de condiciones extremas por ejemplo físicas como la temperatura (-2 a 12°C , 60 - 110°C), químicas como la salinidad (2 - 5 NaCl) y el pH (< 2 , > 9) son extremófilos y constituyen una fuente de enzimas muy interesantes para emplearse en procesos que requieren extrema estabilidad en condiciones que se consideran incompatibles con los materiales biológicos (Adrio & Demain, 2014). Las enzimas procedentes de microorganismos que habitan en temperaturas elevadas se denominan termoenzimas y se consideran candidatas idóneas para los procesos que operan a altas temperaturas (Gomes & Steiner, 2004).

Las termoenzimas tienen diversas áreas de aplicación tales como: en el procesamiento de alimentos, en la industria de la pulpa y el papel, en la de detergentes, en la industria de medicamentos y nutraceuticos, así como en el sector bioenergético con la producción de biocombustibles. Uno de los mejores ejemplos en la aplicación de las termoenzimas son las polimerasas Taq y otras ADN polimerasas, que han revolucionado el área de la ingeniería genética (Atomi, 2005). Los procesos que son mediados por enzimas continúan ganando interés debido a las ventajas asociadas que ofrecen como: bajo consumo de energía, reducción de los tiempos de procesos, generan mayor rentabilidad y no presentan toxicidad, siendo más amigables con el medio ambiente (Choi et al., 2015; S. Li et al., 2012).

Las enzimas se clasifican en seis clases generales, de acuerdo a la comisión de enzimas (CE) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Tipton & Boyce, 2000). En la Tabla 1 se muestra su clasificación de acuerdo a su tipo de reacción.

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

Clase de enzimas		Tipo de reacción
CE1	Oxidorreductasas	Oxidación / reducción
CE2	Transferasas	Transferencia de átomo
CE3	Hidrolasas	Hidrólisis
CE4	Lipasas	Eliminación de grupo
CE5	Isomerasas	Isomerización
CE6	Ligasas	Unión de moléculas ligadas a la ruptura de un enlace pirofosfato

La celulosa es el polímero más abundante en la tierra. Las celulasas se clasifican en tres tipos: endonucleasas, exoglucanasas y beta-glucosidasas. La celulosa está típicamente incrustada en una red de hemicelulosa y lignina, por esta razón requiere un pretratamiento alcalino a altas temperaturas para ser accesible a la hidrólisis enzimática. Por lo que, la industria que utilizan la celulosa en sus actividades necesitan celulasas termoestables, que además deben ser activas a pH altos (Ahmad et al., 2014).

Las xilanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis interna de los enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilano (Collins et al., 2005). Dentro de sus áreas de aplicación están diversos procesos biotecnológicos que se realizan a altas temperaturas, así como en las industrias de alimentación y la pulpa y el papel (Vieille et al., 2006). Estas enzimas se utilizan en aplicaciones industriales para la degradación de las paredes celulares de las plantas, resultando ser una fuente rentable para la producción de biocombustibles. Es por ello que los materiales lignocelulósicos y los desechos agrícolas y forestales representan una fuente interesante para la producción de biocombustibles de segunda generación debido a su bajo costo y abundancia (Bhalla et al., 2013).

Las feruloil esterases son una subclase de esterasa de ácidos carboxílicos con la capacidad de liberar ácidos ferúlicos (FA) y otros ácidos de las paredes celulares de las plantas y los sustratos sintéticos. Estos ácidos se encuentran en hongos, bacterias y plantas, que pueden ser aplicados en varios procesos biotecnológicos como son: industria papelera y producción de bioetanol (Furuya et al., 2017; Gopalan et al., 2015).

Las lipasas forman una parte integral de las industrias y los procesos biotecnológicos, que van desde biodiésel, alimentos, nutracéuticos y detergentes con aplicaciones menores también en las industrias de biorremediación, agricultura, cosmética y papel (Andualema & Gessesse, 2012).

Las proteasas se utilizan en varias industrias entre ellas la láctea, están reemplazando gradualmente a la renina de ternera en la producción de queso. En la fabricación de queso se utilizan proteasas microbianas producidas por microorganismos GRAS como *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *Mucor pusillus* Lindt y *Endothia parasitica*, se utilizan además en alimentos para animales para mejorar el valor nutricional de los alimentos (Adrio & Demain, 2014).

Las beta-glucosidasas tienen diversas aplicaciones en procesos biotecnológicos como la hidrólisis de glucósidos de isoflavona, la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas, la liberación de compuestos aromáticos de glucósidos, entre otros (Singhania et al., 2013).

La beta-xilosidasa (1,4- β -D-xilano xilohidrolasa) es una de las enzimas clave para la hidrólisis de xilanos. Mediante la hidrólisis conjunta de lignocelulosa y hemicelulosa con beta-D-xilanasas puede producir xilooligosacáridos o xilosa, que son compuestos ampliamente utilizados en las industrias de energía, alimentos, piensos y medicamentos (Jonathan et al., 2017; T. Li et al., 2018; Suryani et al., 2004).

1.5 Aguas termales en Galicia

La comunidad autónoma de Galicia ubicada en el noroeste de España posee un gran número de manantiales de aguas minerales de origen exógeno o meteórico, es decir que provienen de la infiltración de aguas de lluvias, que circulan por el subsuelo y pueden alcanzar temperaturas importantes, debido a que reaccionan y disuelven los diferentes materiales rocosos. Galicia es una de las comunidades autónomas del territorio español, más ricas en aguas minero-medicinales, tanto en cantidad como en diversidad de tipos (Ramírez Ortega et al., 2007). Las aguas termales de Galicia constituyen una población adecuada, sin embargo, mayoritariamente inexplorada, debido a que estos microorganismos no pueden ser cultivados de la forma tradicional en un laboratorio, para la búsqueda de nuevas termoenzimas de interés industrial.

1.5 Importancia de la paja de trigo

La necesidad de buscar otras fuentes para la producción de energía alternativa ha llevado a la sociedad al empleo de algunas materias primas que tienen alto contenido en biomasa lignocelulósica pero que a la vez tienen importancia alimentaria por lo que no serían viables. Sin embargo, dentro de los derivados lignocelulósicos hay varios residuos agrícolas que han generado gran interés entre ellos la paja de trigo, y es que además del valor añadido de que con su uso no se compite con la cadena alimentaria, presenta una gran cantidad de generación de energía. En Europa por cada kilogramo de trigo que se produce, se obtiene 1.1 kg de paja (Bagama et al., 2003) y en 2019 según estimaciones de la FAO se produjeron más de 766,4 millones de toneladas a nivel mundial, lo que generaría mas de 842 millones de residuo de paja de trigo, que además de disponerlo para la alimentación animal, por su abundancia y alto contenido en celulosa también se puede emplear para la producción de biocombustibles, como el etanol (Kim & Dale, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Búsqueda de nuevas termoenzimas (celulasas, xilanasas, beta-xilosidasas, beta-glucosidasas, proteasas y lipasas) en aguas termales de As Burgas y Río Caldo (Ourense, Galicia) mediante la construcción de metagenotecas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo ha sido realizado dentro del grupo de investigación EXPRELA, perteneciente al Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de A Coruña, UDC.

3.1 Material biológico

3.1.1 Recogida y procesamientos de muestras ambientales de aguas termales

Para la realización de este trabajo se colectaron muestras de aguas termales de los manantiales Río Caldo y As Burgas en Ourense (Galicia, España). Se recogieron 8 garrafones de muestra de agua, de 25 litros. La muestra de agua se almacenó a temperatura ambiente hasta su filtrado. Se filtró a través de un filtro de nitrocelulosa de

0.22 µm de tamaño de poro, utilizando un equipo de filtración con soporte reutilizable (Nalgene). Los microorganismos atrapados en el filtro se almacenaron a 4°C.

3.1.2 Paja de trigo

Las muestras de paja de trigo de Castilla-León y paja de trigo de Galicia fueron suministradas por las empresas Molifibra-Molienda y Granulación, S. L. (Burgos) y Onega Ares, S. L (Lugo), respectivamente. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente.

3.1.3 Cepa bacteriana

Se han utilizado células de *Escherichia coli* XL1-Blue químicamente competentes, del kit comercial ECOS TM Blue Competent Cells (suministradas por Galmedic).

3.1.4 Vector de clonación

Se ha empleado el vector pSMART-HCAmp, el cual es un plásmido de alta copia que tiene un gen con resistencia a la ampicilina, se adquirió de la casa comercial Lucigen. (Figura 1).

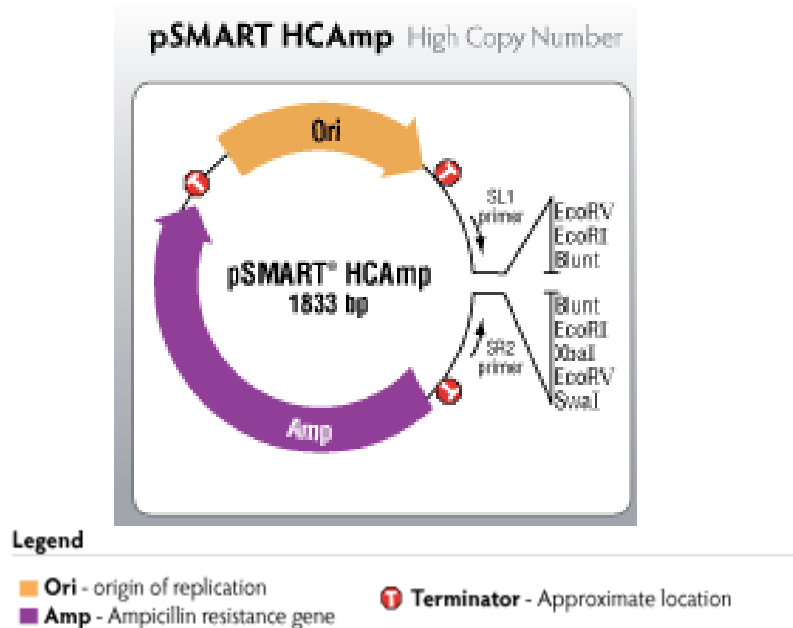


Figura 1. Vector de clonación empleado (<https://www.lucigen.com/pSMART-HC-Amp/>).

3.1.5 Medios y Condiciones de Cultivo

Para el enriquecimiento de los organismos productores de termoenzimas, se utilizó el siguiente medio de cultivo con sales (Tabla 2), con la finalidad de que la única fuente de carbono procediese de la paja de trigo. Se preparó el medio de cultivo disolviendo todos

los componentes en agua filtrada proveniente de cada una de las fuentes termales. Posteriormente el medio de cultivo se mezcló con una batidora durante 2 minutos a máxima velocidad y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 2 Ba de presión durante 20 minutos. La receta del medio se realizó para un volumen de 100 mL.

Tabla 2. Medio de cultivo y nutrientes utilizados (Rahman et al., 2007).

Solución	Compuesto	Concentración
	NaCl	0.2 %
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.04%
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.07 %
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05%
	KH ₂ PO ₄	0.03%
	K ₂ PO ₄	0.03%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 %
Solución de Elementos traza (0.01%)	H ₃ BO ₃	0.026%
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05%
	MnSO ₄	0.05%
	Na ₂ MoO ₄	0.006%
	ZnSO ₄	0.07%

Para la preparación de los siguientes medios de cultivo se emplearon las condiciones mencionadas a continuación.

Los medios se elaboraron disolviendo todos los componentes en agua destilada. La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C y 2 Ba de presión durante 20 minutos. Todas las recetas de los medios utilizados en este trabajo se realizaron para un volumen de 100 mL. En los casos requeridos, se añadió ampicilina a los medios de cultivo después de ser autoclavados y enfriados (aproximadamente a 60°C) para evitar su degradación. Para la preparación de medios sólidos se añadió 1,5% de agar y tras el autoclave se sirvieron en placas de Petri estériles identificadas, finalmente se conservaron en la nevera hasta su uso posterior.

3.1.6 Medios de cultivo para detectar actividades enzimáticas de interés

Para la detección de clones con actividad celulasa se prepararon los medios selectivos que se detallan a continuación (Tabla 3). En el caso del medio AZCL-celulosa se preparó una solución de ACL-HE-Cellulose (Megazyme) al 0.05 % disolviendo en 500 µL de etanol, se agregó tras ser autoclavado el medio junto con la ampicilina.

Debido a que se empleó el plásmido recombinante pSMART-HCAmp para introducir en la cepa de *E. coli*, poseedor de un marcador de resistencia a la ampicilina, este antibiótico es usado en medios de cultivo específicos para confirmar las bacterias que poseen el plásmido (Figura 1).

Tabla 3. Medios de Cultivo para detectar la presencia de Celulasas.

Medios para Celulasas Para 100 mL					
Medio CMC		Medio Avicel		Medio AZCL-Celulosa	
Triptona	1 g	Triptona	1 g	Triptona	1 g
Extracto de levadura	0.5 g	Extracto de levadura	0.5 g	Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1 g	NaCl	1 g	NaCl	1 g
CMC	0.5 g	Avicel polvo	1 g	Agar	1.5 g
Azul de tripán	0.04 g	Azul de tripán	0.04 g	ACL-HE-Celulosa (Megazyme)	0,05g/500 μ L etanol
Agar	1.5 g	Agar	1.5 g		
Ampicilina 100 μ L		Ampicilina	100 μ L	Ampicilina	100 μ L

3.1.6.1 beta-glucosidasas

En la preparación del medio para la detección de beta-glucosidasas (Tabla 4), la solución de 4- Nitrofenil beta-D-glucopiranosido (SIGMA cat N7006) previamente se disolvió en agua y se añadió tras autoclavar el medio al igual que la ampicilina.

Tabla 4. Medio para detectar actividad beta-glucosidasa.

Medio para beta-glucosidasa (para 100 mL)	
Triptona	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1.0 g
Ampicilina	100 μ L
4- Nitrofenil beta-D-glucopiranosido	30.1 mg

3.1.6.2 beta-xilosidasas

Para determinar la presencia de beta-xilosidasa con el método 1, la solución de 4-metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido (SIGMA cat. No. M7008) previamente disuelta en agua destilada, se agregó junto con la ampicilina tras el autoclavado. En la Tabla 5, se muestran los componentes del medio para la detección de beta-xilosidasa con el método 1 y el 2.

Tabla 5. Medio 1 y Medio 2 para detectar la actividad beta-xilosidasa.

Método 1 para beta-xilosidasa (para 100 mL)		Método 2 para beta-xilosidasa (para 100 mL)	
Triptona	1 g	Triptona	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g	Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1g	NaCl	1.0 g
Ampicilina	100 µL	Agar	1.5 g
4-metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido	0.1%	Ampicilina	100 µL

3.1.6.3 Proteasas

Para la detección de proteasas se preparó adicionalmente una solución de leche desnatada al 10 % (2 g de leche desnatada / 20 ml de agua destilada) y se hirvió durante 20 minutos, tras enfriar se agregó la ampicilina al medio autoclavado preparado con los componentes mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Medio para detectar proteasas.

Medio para Proteasas (para 100 mL)	
Triptona	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1 g
Agar	1.5 g
Ampicilina	100 µL

3.1.6.4 Xilanasas

Para determinar la presencia de xilanasas, se preparó una solución de AZCL-Xilano (Megazyme) al 0.05 % disuelto en 500 µl de etanol y se agregó tras autoclavar el medio junto con la ampicilina (Tabla 7).

Tabla 7. Medio para detectar actividad xilanasas.

Medio para Xilanasas (para 100 mL)	
Triptona	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1 g
Ampicilina	100 µL
AZCL-Xilano (Megazyme)	0,05% (500 µL)

3.1.6.5 Lipasas

En la Tabla 8, se muestran los componentes del medio de cultivo utilizado para la detección de la actividad enzimática de la lipasa.

Tabla 8. Medio para detectar actividad lipasa.

Medio para Lipasas (100 mL)	
Peptona	0.5 g
Extracto de levadura	0.5 g
Goma arábica	1.0 g
Tributirina	10 g
Ampicilina	80 µL

3.2.3 Determinación de actividades enzimáticas

3.2.3.1 Detección de actividad de feruloil esterasas

Se utilizó una placa de microtiter de 96 pocillos y se añadió 150 µL de medio LBA líquido con 0.1 mM de sustrato feruloil ácido pNP éster (Galchimia) y se inocularon los clones obtenidos de las metagenotecas. Se utilizaron tres pocillos como blanco (con medio pero sin inocular ningún clon) y uno como control positivo con 1 microlitro de una feruloil esterasa de SIGMA. Se incubó entre 2 y 5 días a 37°C y a 900 rpm.

3.2.3.2 Detección de actividad Celulasa

Se cultivaron los clones obtenidos de todas las metagenotecas en placas de Petri con los medios descritos en la Tabla 3. En el caso del CMC se incubaron a 37°C durante 48h y a 65° durante 24h. En el caso del medio con Avicel se incubaron a 37°C durante 24h y a 65°C otras 24h. Con el medio con AZCL-Celulosa se incubaron a 37°C durante 7 días y posteriormente a 65°C durante 3 días. En todos los casos se observaron las placas tras la incubación para determinar la actividad.

3.2.3.3 Detección de actividad Lipasa

Se utilizaron los clones obtenidos de las metagenotecas y se sembraron en dos placas de Petri con medio LBA y 1% de tributirina (Tabla 8). Se incubaron a 37° durante 72h y a 65°C durante 24h. Se observaron las placas para determinar la presencia o ausencia de actividad lipolítica.

3.2.3.4 Detección de actividad beta-glucosidasa

Para buscar la presencia de beta-glucosidasas, se utilizó una placa microtiter de 96 pocillos, y se añadieron 150 µL de medio LBA líquido con 1 mM 4-Nitritofenil beta-D-glucopiranosido (Tabla 4). Se inocularon los clones provenientes de las metagenotecas. Se utilizaron tres pocillos para blanco que solo contenían medio. La placa se incubó en agitación a 37°C durante 2-5 días a 900 rpm. Se midió la absorbancia a 410 nm y los pocillos con una absorbancia de dos desviaciones estándar por encima de la media de la señal de todos los pocillos se consideraron como candidatos positivos.

3.2.3.5 Detección de actividad beta-xilosidasa

3.2.3.5.1 Método 1

Para determinar la presencia de beta-xilosidasas, se utilizó una placa de microtiter de 96 pocillos, y se añadieron 150 µL de medio LBA con 0.1% de 4-metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido (SIGMA cat. No. M7008) (Tabla 4) y se procedió a inocular los clones de las metagenotecas. Se utilizaron tres pocillos para blanco en los que sólo se inoculó medio de cultivo. La placa se incubó a 37°C durante 6 días a 900 rpm. Se determinó la fluorescencia con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm, ganancia 35. Los pocillos con una absorbancia de dos desviaciones estándar por encima de la media de la señal de todos los pocillos se consideraron como candidatos positivos.

3.2.3.5.2 Método 2

Se utilizaron los clones obtenidos de las metagenotecas, se sembraron en dos placas de Petri con medio LBA (Tabla 5), y se incubaron a 37°C durante 24h, tras lo cual se preparó un sustrato cobertor de unos 20 mL de 1% de agarosa y 0.1% 4-metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido disuelto en 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.0). Se mezcló y se calentó en el horno microondas hasta que se disolvió la agarosa. Se dejó enfriar, sin dejar polimerizar y se cubrieron las placas. Se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se incubó toda la noche a 65°C. Para detectar fluorescencia se observó la placa en un cañón de luz ultravioleta de la casa comercial BIO-RAD.

3.2.3.6 Detección de actividad Proteasa

Para determinar actividad de proteasas, se utilizaron dos placas de Petri con medio LBA y leche desnatada (Tabla 6); se sembraron los clones obtenidos de las metagenotecas y se incubaron a 37°C durante 72h y a 65°C durante toda la noche. Pasado este tiempo se observaron las colonias para confirmar la presencia o ausencia de proteasas.

3.2.3.7 Detección de actividad Xilanasa

Se utilizaron dos placas de Petri que contenían medio LBA y AZCL-Xylan (Tabla 7), donde se sembraron los clones obtenidos de las metagenotecas y se incubaron a 37°C durante 7 días y a 65°C durante 72h.

3.2 MÉTODOS

Como este estudio pretendía buscar, entre otras, enzimas termoestables que puedan degradar la paja de trigo, se realizó un cultivo de enriquecimiento previo a la extracción de ADN metagenómico de las muestras obtenidas de las termas de Río Caldo y As Burgas, con la paja de trigo de Castilla-León y la de Galicia mediante el siguiente procedimiento.

Se agregó 1 filtro de nitrocelulosa (que contenía los microorganismos retenidos tras la filtración de un bidón de 25 litros de cada una de las respectivas fuentes termales) procedente de Río Caldo o As Burgas a 100 ml del medio de cultivo descrito en la (Tabla 1) y 1 g de paja de trigo de Castilla-León o 1 g de la paja de trigo de Galicia. Posteriormente se le midió la absorbancia inicial a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro marca NanoDrop™, tras lo cual se incubó y agitó a

100 rpm con una temperatura de 65°C durante unos cinco días, tras lo que se le determinó la absorbancia final a la misma longitud de onda con la finalidad de confirmar el crecimiento de microorganismos. De ese primer cultivo se extrajo 1 mL y se inoculó un nuevo matraz con los mismos componentes que el primero. Se incubó durante otros cinco días a 65°C a 100 rpm y se extrajo nuevamente 1 mL de medio que se procedió a inocular en un tercer matraz (Figura 2). Tras los 15 días de incubación, se recogió el medio líquido de los tres matraces (evitando llevarse los restos de paja de trigo) y se procedió a centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó con cuidado el sobrenadante para quedarnos únicamente con las células que habían crecido. Las muestras de los tres matraces se mezclaron para obtener un único tubo con células para cada ensayo. Estas muestras se conservaron a 4°C hasta su posterior uso. Se siguió el mismo procedimiento para los filtros procedentes de las termas de Río Caldo con los dos tipos de paja.



Figura 2. Matraces con los medios de cultivo de enriquecimiento con las muestras de paja de trigo de Castilla-León y Galicia.

3.2.1 Tinción y observación de células bacterianas al microscopio

Para la observación con el microscopio óptico se tiñeron las células con azul de metileno. Es un método de tinción simple (no específico) con un cromóforo básico. Se extendieron los cuatro tipos de cultivo de enriquecimiento (aguas termales de As Burgas y de Río Caldo incubadas con paja de trigo de Castilla-León o de Galicia) sobre un portaobjetos y se dejó secar y se pasó el portaobjetos 4 o 5 veces por la llama para fijar las células por calor, se cubrió con la solución de azul de metileno al 0.1% y se dejó teñir durante 3 minutos, con agua destilada se retiró el exceso de colorante y se observaron con el microscopio óptico.

3.2.2 Técnicas de Manipulación Genética

3.2.2.1 Extracción de ADN Metagenómico

Para la extracción del ADN metagenómico de los cuatro tipos de cultivo de enriquecimiento (aguas termales de As Burgas o de Río Caldo incubadas con paja de trigo de Galicia o de Castilla-León), se utilizó un kit comercial (Kit DNeasy PowerSoil Pro) siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Este es un método novedoso y patentado que permite aislar altos rendimientos de ADN genómico microbiano de muestras ambientales.

En un tubo de PowerBead (suministrado en el kit) se agregaron 250 mg de pellet y 800 µL de solución CD1. Se mezcló de forma horizontal con la ayuda de un vortex durante 10 minutos. Se centrifugó a 15.000 durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo proporcionado por el kit, se agregaron 200 µL de solución CD2, se mezcló con la ayuda de un vortex durante 5 segundos. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto y se transfirieron 700 µL de sobrenadante a un tubo limpio. Se agregaron 600 µL de Solución CD3 y se llevó al vortex durante 5 segundos. Se añadieron 650 µL de lisado en una columna de centrifugado MB. Posteriormente, este lisado se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto, el sobrenadante se eliminó y se repitió el paso de lisado. La columna de centrifugación MB se colocó en un tubo de recogida. Se agregaron 500 µL de solución EA a la columna de centrifugado MB y se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el flujo, la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de solución C5 a la columna. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el flujo y la columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección. Se centrifugó a 16.000 rpm durante 2 minutos y la columna se transfirió a un nuevo tubo de elución, se agregaron de 50–100 µL de solución C6 al centro de la membrana del filtro y centrifugó a 15.000 rpm durante 1 min. El ADN se conservó a -20°C.

3.2.2.2 Cuantificación del ADN

La pureza y la concentración del ADN metagenómico se determinaron mediante análisis de espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm usando un NanoDropTM / Espectrofotómetro.

3.2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa 0.3%

Para la separación de las biomoléculas del ADN metagenómico se realizaron varias electroforesis en gel de agarosa 0.3%. Para ello se pesó y mezcló: 0.09 g de agarosa con

30 ml de tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE; Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM), se calentó en el horno microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejó enfriar unos 6 minutos y se vertió en un molde de 10 cm de largo, con un peine de 8 pocillos. Se dejó polimerizar durante 30 minutos, se colocó el molde con el gel en una cubeta horizontal que contenía tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE), y se retiró el peine. Los pocillos se cargaron con 14 μ L de muestra (contenían 10 μ L de ADN y 4 μ L de tampón de carga que contenía Gel Green de la casa comercial Biotium). Como referencia de pesos moleculares se emplearon 4 μ L del marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder y 4 μ L del marcador GeneRuler High Range DNA Ladder, ambos de Fermentas.

La función del Gel Green es servir de intercalante entre las bases de los ácidos nucleicos, debido a su naturaleza fluorescente que permite su detección al iluminarse con luz ultravioleta. Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando un voltaje de 65 V y se dejaron correr durante 1 hora. La visualización del gel se realizó con el transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR de la casa BioRad.

3.2.2.4 Fragmentación del ADN metagenómico

Para la fragmentación del ADN metagenómico de As Burgas o Rio Caldo con paja de trigo de Castilla-León o Galicia se procedió a diluir el ADN hasta 150 μ L con H₂O bidestilada. La fragmentación se realizó mediante un kit comercial (g-TUBE de Covaris) según las instrucciones del fabricante. Se empleó el siguiente protocolo:

Se colocó el g-TUBE en la posición de carga del soporte, se ajustó. Se retiró el tapón de rosca del g-TUBE y se cargó 150 μ L de muestra en la parte superior del tubo. Nos aseguramos de que la muestra estaba libre de partículas y que el ADN estaba completamente disuelto. Se cerró el g-TUBE y se atornilló la tapa muy firmemente, se continuó con el siguiente paso antes de transcurrir 15 minutos. Se cargó el g-TUBE (tapa de rosca hacia arriba) en la centrifuga. Se ajustó la centrifuga a la velocidad de 10.000 rpm por 30 segundos. Se retiró el g-TUBE de la centrifuga, se comprobó visualmente que toda la muestra se había drenado de la cámara superior del g-TUBE. Se invirtieron los g-TUBE, colocando el rotor (tapón de rosca hacia abajo) y se centrifugó nuevamente usando la misma velocidad y duración anterior. Se continuó con el siguiente paso antes de transcurrir 15 minutos. Se transfirió el g-TUBE de la centrifuga a la posición de descarga del soporte, manteniendo el tapón de rosca hacia abajo todo el

tiempo. Se desenroscó el cuerpo del tubo dejando el tapón de rosca que contiene la muestra en el soporte. Se recuperó la muestra del tapón de rosca.

3.2.2.5 Concentración del ADN fragmentado

Se limpió y concentró el ADN tras su fragmentación utilizando el kit DNA Clean & ConcentratorTM de la casa comercial (ZYMO RESEARCH). Este es un kit de purificación que proporciona la purificación de hasta 5 µg de ADN de PCR, digestiones de endonucleasas, reacciones de modificación de ADN, reacciones de marcado de isótopos / fluorescencia. Se empleó el siguiente protocolo:

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se agregan 2-7 Volúmenes de tampón de unión de ADN por cada volumen de muestra de ADN. Se mezcló brevemente utilizando el vortex. Se transfirió la mezcla a una columna de Zymo- SpimTM provista de un tubo de colección. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 segundos. Se desechó el flujo. Se agregaron 200 µL de DNA Wash Buffer a la columna. Se centrifugó por 30 segundos a 10.000 rpm y se repitió el paso de lavado. Se agregaron ≥ 6 µL de tampón de elución de ADN o agua directamente a la matriz de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 segundos, para eludir el ADN. El ADN ultra puro ahora está listo para usar.

3.2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa 0.8%

Una vez obtenido el ADN concentrado y fragmentado se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% siguiendo el protocolo mencionado previamente (apartado 3.2.2.3).

3.2.2.7 Ensayo de reparación de los fragmentos de ADN

Se repararon los extremos del ADN fragmentado extraído. Para ello se utilizaron las condiciones y los reactivos del kit comercial pCC1FOS library construction kit de Epicentre. En un tubo de Eppendorf se añadieron: 34.5 µL de ADN, 4.5 µL de H₂O bidestilada estéril, 6 µL de End repair buffer, 6 µL de dNTPs, 6 µL de ATP y 4.5 µL de Enzyme. Se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos, luego se inactivó a 70°C durante 10 minutos.

A continuación, se procedió a limpiar y concentrar el ADN utilizando el kit DNA Clean & ConcentratorTM de la casa comercial (ZYMO RESEARCH) tal y como se describió

anteriormente (apartado 3.2.2.5). Se realizó una elución con 10 μL de H_2O bidestilada estéril.

3.2.2.8 Construcción de metagenotecas de aguas termales

Para la construcción de las metagenotecas se partió de 6 μL del ADN metagenómico extraído de las aguas termales de As Burgas o Rio Caldo (Ourense, Galicia), con paja de trigo de Castilla-León o paja de trigo de Galicia. El vector que se utilizó fue pSmart HCamp de Lucigen (Figura 1).

3.2.2.9 Ensayo de ligamiento de los fragmentos con el vector pSmart

Se procedió a realizar el ligamiento de los fragmentos con el vector pSmart HCamp. Se utilizaron las condiciones y los reactivos del kit *CloneSmart*[®] Cloning de la casa comercial Lucigen. Se añadieron en un microtubo de PCR 100-500 ng de ADN, 0.5 μL de H_2O bidestilada estéril, 3 μL de 4x cloning Smart premix que previamente fue centrifugado durante 6 segundos y 1 μL de cloning Smart ligasa de ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante dos horas, pasado este tiempo se inactivó la enzima de ligación incubando a 70°C durante 15 minutos. Se enfrió 15 segundos a temperatura ambiente y 15 segundos sobre hielo, por último, se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto, y se conservó a -20°C.

3.2.2.10 Preparación de células electrocompetentes

Tras obtener los vectores con los insertos, se prepararon las células electrocompetentes para tener mayor eficacia. La preparación de las células electrocompetentes se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tu y colaboradores (Tu et al., 2016).

En tubos de Eppendorf con 1 mL de medio LB fresco (1% bactotripton, 0.5 % extracto levadura, 0.5 % NaCl), se inoculó una cepa de *E. coli* y se cultivó en agitación a 37°C durante toda la noche. Tras lo cual 30 μL del cultivo se pasaron a 1.4 mL de medio LB, se cultivaron de nuevo a 37°C a 900 rpm en un Eppendorf Thermomixer.

Tras dos horas de incubación se tomó una alícuota para confirmar que la OD600 nm alcanzara aproximadamente 0.6, las células se centrifugaron tres minutos a 9.000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó, y las células se resuspendieron en 1 mL de agua destilada a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso de lavado con agua destilada. Tras la nueva centrifugación y eliminación del sobrenadante, las células se resuspendieron en 30 μL

de H₂O destilada (a temperatura ambiente). Se añadió un µlitro del ADN, y la mezcla célula-ADN se transfirió a una cubeta de electroporación de 1.0 mm. La electroporación se llevó a cabo a 10 microF, 600 Ohms, 1800 V (pulso de 5 ms). Se añadieron 975 µL de medio LBA fresco y se pasaron las células a tubo Eppendorf. Las células se recuperaron durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo se plaqueó en 10 placas con medio LB (100 µL/placa). El medio LBA es medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina 100 mg/L.

Otro kit que se utilizó para la electroporación fue el kit *E. cloni*[®] 10G Electrocompetent Cells de la casa comercial (Lucigen). Para la transformación, se colocó en hielo el tubo de microcentrífuga y la cubeta para la electroporación 10 minutos antes de empezar el ensayo. Las alícuotas con las células de *E. coli* del kit se retiraron del congelador a -80°C y se colocaron en hielo durante 10 o 20 minutos hasta que se descongelaron por completo. Una vez descongeladas se mezclaron suavemente y se agregaron 25 µL de las células de *E. coli* al tubo de microcentrífuga, 1 µL del ADN a transformar, mezclado con punta de pipeta para no producir burbujas de aire y calentar las células. La mezcla células/ADN se transfirió a una cubeta de electroporación de 1.0 mm. La electroporación fue a 10 microF, 600 Ohms, 1800 V (pulso de 5 ms). Se añadieron 975 µL de medio de recuperación suministrado con el Kit y se pasaron las células a tubos Eppendorf. Las células se recuperaron durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo se plaqueó en 10 placas con medio LBA (100 microlitros/placa).

3.2.4 Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico de un cultivo recombinante de *E. coli* se realizó utilizando el kit comercial GeneJET (ThermoFisher Scientific®). Este kit utiliza una tecnología basada en una membrana de silica en una columna de spin. Separando hasta 20 ng de ADN plasmídico con un alto grado de pureza. Además, es un método rápido, de bajo coste y efectivo. El rendimiento del proceso depende del número de copias del plásmido y el medio de cultivo utilizado.

El primer paso para llevar a cabo la extracción es pasar a una alícuota un volumen de células recombinantes cultivadas en medio líquido y centrifugación a 8000 rpm durante dos minutos. Se desecha el sobrenadante y el pellet será el que se resuspende en 250 µL de solución de resuspensión con ayuda de un vortex.

Posteriormente, se añadieron 250 µL de tampón de lisis para romper las células por lisis alcalina y se invirtió el tubo 4-6 veces. Esta solución también promueve la

desnaturalización del ADN. Luego se añadieron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión 4-6 veces. Con esta solución, el ADN genómico se aparea formando agregados que precipitan, mientras que el ADN plasmídico permanece soluble. Posteriormente, este lisado celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue transferido a una de las columnas proporcionadas con el kit y se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron 500 µL de la solución de lavado con etanol, se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm y se volvió a repetir este paso, para eliminar el etanol restante. Por último, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf y se añadieron 50 µL de agua destilada, para eluir el plásmido de ADN.

3.2.5 Ensayo de PCR del ADN plasmídico

Se realizó una PCR con el ADN plasmídico obtenido de los nueve clones que presentaron actividad positiva. Los ciclos de temperatura de la amplificación fueron los siguientes: 5 minutos a 94°C, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 61°C, 1 minuto a 72°C, los tres últimos pasos se repitieron 30 veces, y por último 10 minutos a 72°C. Para la reacción se preparó una mezcla de: 2 µL x 9 de tampón taq 10x polimerasa, 5 µL x 9 del cebador 1, 5 µL x 9 del cebador 2, 2 µL x 9 de dNTPs y 4 µL x 9 de H₂O bidestilada estéril; se agregaron 18 µL de esta solución a nueve tubos de PCR identificados previamente. Por último, se añadió 1 µL de ADN y 1 µL de polimerasa.

Para confirmar la amplificación de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% siguiendo las mismas condiciones que se describieron previamente (apartado 3.2.2.6).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción de metagenotecas de aguas termales de As Burgas y Río Caldo con el sustrato paja de trigo de Castilla-León o paja de trigo de Galicia.

El ADN extraído a partir de las células obtenidas tras el cultivo de enriquecimiento de las aguas termales de As Burgas y Río Caldo (Ourense, Galicia) con paja de trigo de Castilla-León o de Galicia, presentaron las siguientes concentraciones (Tabla 9).

Tabla 9. ADN metagenómico (C: Paja de trigo de Castilla-León; G: Paja de trigo de Galicia).

As Burgas y Río Caldo C/G	Concentración
As Burgas C.	230,1 µg/mL
Río Caldo C.	169,1 µg/mL

As Burgas G.	213,0 µg/mL
Río Caldo G.	104,0 µg/mL

Para verificar la integridad del ADN obtenido de todas las muestras se realizó un gel de electroforesis al 0,3%. En la figura 3 se muestra el gel de electroforesis obtenido con las muestras de Río Caldo y As Burgas incubadas en presencia de paja de trigo gallega.

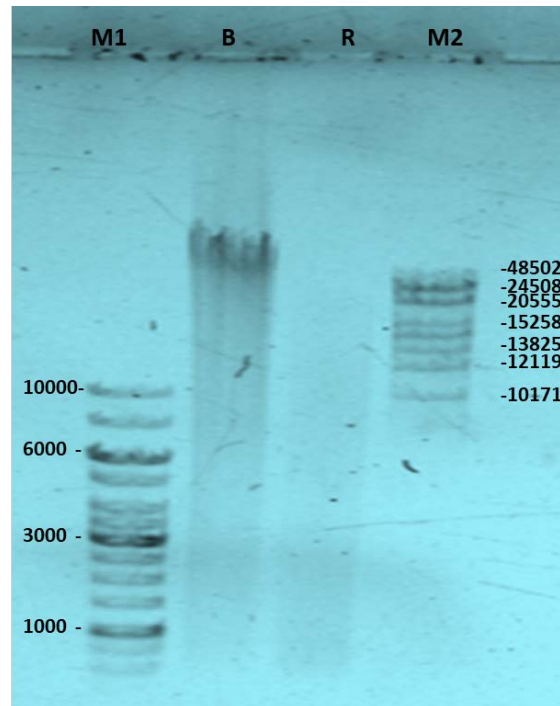


Figura 3. Electroforesis del ADN metagenómico obtenido de As Burgas y Río Caldo con paja de trigo gallega. M1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb, B: As Burgas, R: Río Caldo, M2: marcador GeneRuler HR.

Se observa (Figura 3) que el ADN metagenómico procedente de As Burgas tiene un tamaño superior a los 50.000 pb, mientras que para el caso del ADN metagenómico de Río Caldo, no se ve una banda clara y aparece como si fuese un degradado a lo largo del carril.

Aunque no se muestran los resultados, para el caso de las muestras de Río Caldo y As Burgas incubadas en presencia de paja de trigo de Castilla-León, el ADN metagenómico dió un resultado similar al observado con la paja de trigo de Galicia.

Con estos cuatro ADNs metagenómicos obtenidos se procedió a fragmentarlos con los g-TUBE de Covaris con la idea de conseguir fragmentos de aproximadamente unos 6 Kpb que nos permitiesen clonarlos en el vector pSMART-HCAmp (Figura 1), como durante la fragmentación del ADN se generan fragmentos con los extremos dañados,

previamente se tuvieron que reparar los extremos con el kit comercial pCC1FOS library para generar extremos romos adecuados para proceder al ligamiento con el vector. Tras la reacción de ligamiento se procedió a transformar mediante electroporación las células electrocompetentes *E. coli* XL1-Blue.

4.2 Resultados de la transformación de células electrocompetentes con los ligamientos.

Como resultado de la electroporación de las células con los cuatro ligamientos se obtuvieron un total de 74 clones. De los cuales 55 pertenecen a la muestra de As Burgas con paja de trigo de Galicia y 19 clones a Río Caldo con paja de trigo de Galicia. Para las muestras de las aguas termales incubadas con paja de trigo de Castilla-León no se obtuvieron clones en ninguno de los casos.

Para intentar mejorar la eficacia de transformación se utilizó el kit *E. coli* 10G Electrocompetent Cells, sin embargo no se obtuvieron clones en ninguna de las cuatro condiciones.

Los clones obtenidos de las metagenotecas de las termas de As Burgas y Río Caldo, se subcultivaron en diferentes medios de cultivo selectivos, para la detección de actividades enzimáticas. Los resultados se describen a continuación.

4.3 Cribado funcional de enzimas ferulil esterases

Se seleccionaron los pocillos que contenían los clones D37, D38 y D41, estos clones fueron extraídos a partir de la genoteca de agua termales de As Burgas, con el sustrato (paja de trigo de Galicia). Los tres candidatos anteriormente mencionados fueron seleccionados porque presentaron absorbancia de dos desviaciones estándar por encima de la media de los demás. Estos clones están pendientes del resultado de la secuenciación (Tabla 10).

Tabla 10. Detección de actividad feruloil esterasa para los 74 clones obtenidos. Se resalta en rojo aquellos que se consideraron positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,514	1,045	1,532	0,803	1,137	1,595	1,312	0,075	1,25	1,666	1,096	0,626
	0,553	1,063	1,489	0,812	1,149	1,511	1,313	0,048	1,246	1,619	1,091	0,631
	-0,221	-0,099	0,239	-0,048	-0,069	0,467	-0,001	0,152	0,023	0,256	0,028	-0,029
	0,674	2,302	2,576	1,513	2,107	2,764	2,04	0,596	2,334	2,086	1,59	0,941
	-3,055	-23,277	10,76	-31,67	-30,583	5,915	-1835,64	3,912	102,468	8,145	57,254	-32,556
B	1,092	0,083	0,423	0,31	0,989	0,608	0,452	1,143	0,253	0,614	0,572	0,803
	1,109	0,043	0,408	0,278	0,979	0,588	0,448	1,11	0,226	0,626	0,581	0,771
	-0,098	0,226	0,08	0,181	0,054	0,113	0,022	0,184	0,151	-0,066	-0,053	0,178
	2,207	0,689	2,084	1,841	2,128	2,061	2,069	2,614	1,636	1,659	2,263	0,968
	-22,567	3,054	26,045	10,199	39,084	18,182	93,109	14,215	10,823	-25,087	-42,429	5,446
C	0,881	1,351	0,095	0,347	1,019	1,078	0,313	0,679	0,077	0,515	1,308	1,084
	0,872	1,282	0,041	0,344	1,06	1,065	0,272	0,668	0,041	0,501	1,241	1,122
	0,051	0,384	0,298	0,013	-0,226	0,075	0,229	0,063	0,198	0,081	0,374	-0,213
	1,958	2,388	0,753	1,337	1,843	2,397	1,952	2,431	0,619	1,982	2,25	2,307
	38,317	6,213	2,523	104,658	-8,149	31,964	8,528	38,387	3,119	24,6	6,008	-10,813
D	2,066	1,743	1,167	1,219	1,698	1,5	0,092	0,104	0,085	0,366	0,791	1,64
	1,893	1,664	1,046	1,127	1,631	1,431	0,048	0,06	0,041	0,355	0,758	1,667
	0,96	0,44	0,673	0,511	0,371	0,384	0,243	0,245	0,244	0,062	0,181	-0,152
	2,872	3,005	2,669	2,506	2,825	2,246	0,738	0,763	0,704	1,855	2,318	2,59
	2,992	6,83	3,963	4,909	7,611	5,851	3,038	3,116	2,888	30,078	12,836	-17,013
E	1,56	0,442	1,086	1,215	1,066	1,281	0,117	0,503	0,505	0,252	1,113	1,342
	1,603	0,411	1,057	1,213	1,041	1,257	0,066	0,47	0,492	0,224	1,086	1,295
	-0,236	0,174	0,162	0,009	0,137	0,133	0,279	0,179	0,073	0,153	0,148	0,261
	2,695	2,132	2,36	2,183	2,342	2,405	0,788	1,779	1,945	1,419	2,185	2,533
	-11,439	12,262	14,545	245,632	17,134	18,113	2,821	9,913	26,725	9,257	14,783	9,701
F	0,469	1,284	0,043	0,054	0,1	1,286	0,852	1,326	1,559	0,77	0,205	0,477
	0,43	1,239	0,045	0,055	0,102	1,274	0,684	1,256	1,516	0,883	0,224	0,513
	0,212	0,252	-0,007	-0,003	-0,011	0,069	0,928	0,387	0,239	-0,626	-0,102	-0,202
	2,093	2,646	0,053	0,068	0,136	2,412	2,401	2,063	2,514	2,202	0,603	2,314
	9,887	10,492	-7,95	-24,624	-12,837	35,006	2,587	5,327	10,522	-3,517	-5,931	-11,441
G	0,86	1,288	1,275	0,404	0,043	0,041	0,042	0,043	0,04	0,04	0,045	0,042
	0,897	1,04	1,292	0,387	0,044	0,041	0,042	0,044	0,041	0,041	0,045	0,043
	-0,205	1,376	-0,092	0,091	-0,006	0	-0,004	-0,004	-0,007	-0,006	-0,003	-0,003
	2,459	2,211	2,111	1,346	0,053	0,047	0,051	0,054	0,047	0,047	0,056	0,05
	-11,996	1,607	-23,035	14,774	-8,673	?????	-11,43	-12,06	-6,99	-8,37	-16,71	-14,94

4.4 Cribado funcional de enzimas Celulasas

En los clones de las metagenotecas de aguas termales de As Burgas y Río Caldo en presencia de paja de trigo de Galicia, no se pudo detectar actividad celulasa en ninguna de las tres condiciones ensayadas.

4.5 Cribado funcional de enzimas Lipasas

Únicamente el clon número 57 de la metagenoteca proveniente de aguas termales de As Burgas con el sustrato paja de trigo de Galicia, presentó actividad positiva mostrando un halo transparente alrededor de la colonia como se muestra en la Figura 4, los demás clones no presentaron actividad.

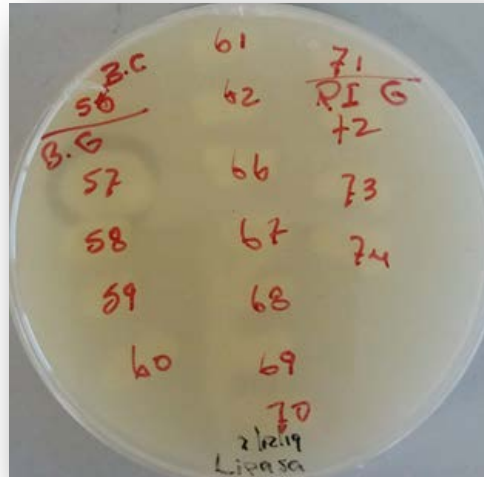


Figura 4. Clon 57 con actividad positiva de la metagenoteca con agua de As Burgas y paja de trigo de Galicia.

4.6 Cribado funcional de enzimas beta-glucosidasas

Se seleccionaron los pocillos que contenían los clones A4, A9 y B13 proveniente de la metagenoteca de aguas termales de As Burgas con paja de trigo de Galicia. También se seleccionó el pocillo G72 de la metagenoteca de aguas termales de Río Caldo con paja de trigo de Galicia. Para detectar la actividad se midió la absorbancia a 410nm. Los cuatros clones seleccionados presentaron absorbancia de dos desviaciones estándar por encima de la media de la señal de todos los pocillos. Considerándose como candidatos positivos. En la siguiente tabla (Tabla 11) se muestra la absorbancia para cada uno de los clones obtenidos.

Tabla 11. Detección de actividad beta-glucosidasa para los 74 clones obtenidos. Se resalta en rojo aquellos que se consideraron positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,158	0,143	0,241	0,232	0,204	0,179	0,201	0,234	0,179	0,188	0,137	0,055
	0,088	0,079	0,179	0,184	0,198	0,108	0,132	0,169	0,108	0,132	0,07	0,082
	0,379	0,358	0,346	0,377	0,388	0,402	0,383	0,381	0,404	0,311	0,388	-0,037
	0,295	0,387	2,403	2,34	2,188	1,404	1,488	1,933	2,583	1,489	0,488	0,179
B	0,779	1,079	6,943	7,794	5,934	3,492	3,883	5,353	8,338	4,721	1,328	-4,801
	0,179	0,179	0,242	0,195	0,181	0,171	0,177	0,172	0,182	0,18	0,198	0,208
	0,115	0,104	0,15	0,124	0,109	0,097	0,102	0,1	0,109	0,109	0,125	0,148
	0,365	0,416	0,508	0,395	0,403	0,413	0,414	0,399	0,407	0,398	0,402	0,335
C	2,776	1,115	1,032	1,081	0,987	0,914	0,888	0,798	1,007	1,073	1,238	2,099
	7,82	2,883	2,03	2,886	2,401	2,215	2,138	2	2,478	2,893	3,072	6,287
	0,188	0,204	0,158	0,181	0,197	0,201	0,179	0,181	0,151	0,158	0,185	0,202
	0,128	0,097	0,135	0,103	0,116	0,088	0,078	0,072	0,072	0,09	0,102	0,087
D	0,398	0,37	0,478	0,394	0,303	0,393	0,424	0,428	0,487	0,335	0,396	0,494
	1,342	1,085	0,283	0,93	0,953	0,981	0,898	0,939	0,278	0,917	0,898	1,588
	3,393	2,932	0,59	2,382	3,142	2,497	2,115	2,204	0,595	2,738	2,271	3,215
	0,198	0,171	0,207	0,181	0,188	0,185	0,181	0,153	0,148	0,165	0,184	0,108
E	0,389	0,412	0,401	0,431	0,401	0,428	0,458	0,445	0,422	0,422	0,458	0,105
	0,589	0,905	1,087	0,908	0,949	0,885	0,284	0,283	0,278	0,908	0,938	0,682
	1,512	2,2	2,664	2,105	2,37	2,029	0,619	0,588	0,655	2,155	2,048	6,309
	0,215	0,186	0,224	0,172	0,209	0,212	0,188	0,187	0,189	0,172	0,189	0,121
F	0,145	0,093	0,153	0,109	0,143	0,137	0,075	0,093	0,119	0,101	0,099	0,093
	0,387	0,408	0,396	0,347	0,389	0,418	0,508	0,414	0,392	0,396	0,382	0,154
	1,328	1,089	0,28	0,831	0,284	1,155	1,138	1,317	1,378	1,332	2,097	0,384
	4,324	2,915	0,63	1,537	0,612	2,924	2,79	3,429	3,658	3,345	8,019	1,055
G	0,151	0,378	0,151	0,144	0,058	0,055	0,059	0,053	0,14	0,071	0,058	0,058
	0,073	0,343	0,108	0,087	0,082	0,08	0,082	0,058	0,143	0,077	0,081	0,082
	0,431	0,194	0,247	0,432	-0,029	-0,029	-0,018	-0,025	-0,017	-0,033	-0,03	-0,033
	0,254	2,83	1,999	0,308	0,154	0,15	0,168	0,149	0,235	0,184	0,15	0,158
	0,589	15,067	8,087	0,714	-5,244	-5,21	-9,689	-5,834	-13,634	-5,523	-5,013	-4,677

4.7 Cribado funcional de enzimas beta-xilosidasas

Con el método 1 se determinó la fluorescencia con una excitación de 360 nm y emisión a 460 nm, ganancia 35, y se seleccionó el pocillo 73 el cual contenía un clon proveniente de la metagenoteca de aguas termales de Río Caldo cultivado con paja de trigo de Galicia, ya que fue el único que se detectó fluorescencia a una absorbancia de dos desviaciones estándar por encima de la media de la señal de todos los pocillos.

Por otro lado, con el método 2, en ninguno de los casos se les detectó fluorescencia a los clones analizados.

4.8 Cribado funcional de Proteasas y Xilanasas

Ninguno de los 74 clones obtenidos presentaron actividad proteasa ni xilanasas.

4.9 Extracción de ADN plasmídico

Con la finalidad de secuenciar los nueve clones que presentaron actividad positiva, se extrajo el ADN plasmídico y se determinó la concentración obtenida para cada uno de ellos (Tabla 12). En la actualidad se está pendiente de los resultados de la secuenciación y posterior análisis de la secuencia.

Tabla 12. Concentración del ADN plasmídico de los nueve clones que presentaron actividad positiva

Enzimas	Clon	Concentración	As Burgas / Río Caldo
beta-glucosidasa	4	20,1 µg/mL	As Burgas
beta-glucosidasa	9	39,8 µg/mL	As Burgas
beta-glucosidasa	13	48,0 µg/mL	As Burgas
beta-glucosidasa	72	66,8 µg/mL	Río Caldo
Feruloil esterasa	37	80,9 µg/mL	As Burgas
Feruloil esteasa	38	56,0 µg/mL	As Burgas
Feruloil esterasa	41	54,5 µg/mL	As Burgas
Lipasa	57	125,5 µg/mL	As Burgas
beta-xilosidasa	73	90,1 µg/mL	Río Caldo

5. CONCLUSIONES

Por el momento, no se obtuvieron clones a partir de los ADN metagenómicos extraídos de los cultivos de enriquecimiento de las aguas de As Burgas y Río Caldo en presencia de paja de trigo de Castilla-León.

Se obtuvieron 19 clones procedentes del ADN metagenómico extraído de los cultivos de enriquecimiento de las aguas de Río Caldo en presencia de paja de trigo de Galicia. De estos 19 clones se aisló 1 clon con actividad para beta-glucosidasas y 1 clon con actividad beta-xilosidasa.

Se obtuvieron 55 clones procedentes del ADN metagenómico extraído de los cultivos de enriquecimiento de las aguas de As Burgas en presencia de paja de trigo de Galicia. De los cuales se aislaron 3 clones con actividad beta-glucosidasa, 3 clones con actividad feruloil esterasa y un clon con actividad lipasa.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo fin de Máster es un trabajo preliminar. Aunque es obvio que es necesario realizar estudios más profundos y detallados para la identificación de nuevas termoenzimas en As Burgas y Río Caldo, los resultados obtenidos por el momento son prometedores. Actualmente se está pendiente de los resultados de secuenciación y una vez obtenidos habría que comparar la secuencia con las bases de datos conocidas para verificar si se ha identificado un gen no descrito previamente. En caso afirmativo sería interesante realizar la expresión heteróloga y caracterización bioquímica (determinación de la temperatura óptima, pH óptimo, termoestabilidad, cinética enzimática, influencia de la presencia de diferentes iones metálicos,.....) de las enzimas (lipasa, beta-glucosidasa, feruloil esterasa y la beta-xilosidasa) obtenidas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>
- Ahmad, N., Rashid, N., Haider, M. S., Akram, M., & Akhtar, M. (2014). Novel maltotriose-hydrolyzing thermoacidophilic type III pullulan hydrolase from *Thermococcus kodakarensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 1108–1115. <https://doi.org/10.1128/AEM.03139-13>
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143–169. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01974.x>
- Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications: Review. In *Biotechnology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 100–118). <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>
- Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.013>
- Bamaga, O.A., Thakur, T.C., Verma, M. L. (2003). Assessment of Cereal Straw Availability in Combine Harvested Fields and its Recovery by Baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Afrca and Latin America*, 34(2), 53–58.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>
- Canganella, F., & Wiegel, J. (2014). Anaerobic thermophiles. *Life*, 4(1), 77–104. <https://doi.org/10.3390/life4010077>
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Culligan, E. P., Sleator, R. D., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2014). Metagenomics and novel gene discovery: Promise and potential for novel therapeutics. *Virulence*, 5(3), 399–412. <https://doi.org/10.4161/viru.27208>
- DeCastro, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., & González-Siso, M. I. (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01521>
- Devi, S. G., Fathima, A. A., Radha, S., Arunraj, R., Curtis, W. R., & Ramya, M. (2015). A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132441>
- Elleuche, S., Schäfers, C., Blank, S., Schröder, C., & Antranikian, G. (2015). Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.011>
- Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W. R., Golyshina, O. V., & Golyshin, P. N. (2016). Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: Current status and future trends. *Microbial Biotechnology*, 9(1),

- 22–34. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12309>
- Furuya, T., Kuroiwa, M., & Kino, K. (2017). Biotechnological production of vanillin using immobilized enzymes. *Journal of Biotechnology*, 243, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.021>
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223–235.
- Gopalan, N., Rodríguez-Duran, L. V., Saucedo-Castaneda, G., & Nampoothiri, K. M. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology*, 193, 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5(10). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Jonathan, M. C., DeMartini, J., Van Stigt Thans, S., Hommes, R., & Kabel, M. A. (2017). Characterisation of non-degraded oligosaccharides in enzymatically hydrolysed and fermented, dilute ammonia-pretreated corn stover for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0803-3>
- Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Li, T., Wu, Y. R., & He, J. (2018). Heterologous expression, characterization and application of a new β -xylosidase identified in solventogenic *Clostridium* sp. strain BOH3. *Process Biochemistry*, 67(June 2017), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.003>
- Lindgreen, S., Adair, K. L., & Gardner, P. P. (2016). An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19233>
- Littlechild, J. A. (2015). Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts. *Archaea*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/147671>
- López-López, O., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2013). Hot spring metagenomics. *Life*, 3(2), 308–320. <https://doi.org/10.3390/life3020308>
- Ramírez Ortega, A., Rial Lemos, M. E., & Ramírez Masferrer, J. Á. (2007). Las Aguas Minero-Medicinales De Galicia: Un Patrimonio Geológico Singular. *De Re Metallica*, 8, 49–64.
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., & Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/373275>
- Reigstad, L. J., Bartossek, R., & Schleper, C. (2011). Preparation of high-molecular weight dna and metagenomic libraries from soils and hot springs. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 496). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00013-0>
- Sarmiento, F., Peralta, R., & Blamey, J. M. (2015). Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and*

- Biotechnology*, 3(OCT). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00148>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Streit, W. R., Daniel, R., & Jaeger, K. E. (2004). Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.006>
- Suryani, Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2004). Sequencing and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* β -xylosidase Xyl43B in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(3), 609–614. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.609>
- Taupp, M., Mewis, K., & Hallam, S. J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.010>
- Tipton, K., & Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16(1), 34–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.34>
- Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., Stewart, A. F., Müller, R., & Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific Reports*, 6(1), 24648. <https://doi.org/10.1038/srep24648>
- Tulasi, S., Littlechild, J., & Yutaka, K. (2013). Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*.
- Vieille, C., Zeikus, G. J., & Vieille, C. (2006). Hyperthermophilic Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 324. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1>